

—平成18年度 岐阜薬科大学特別研究費（奨励）—

脳由来神経栄養因子による大脳皮質神経細胞層の構築 制御とその不全による神経回路の変化

福 光 秀 文

1. 緒 言

哺乳類の高次脳機能は大脳皮質の神経活動によって支えられている。大脳皮質では神経細胞が層状に「配置」され、各神経細胞は自身の層に固有の形態、遺伝子発現や投射入力などの性質（今後これらを「層特性」と呼ぶ）を持つように分化している。この神経細胞の「配置」と「層特性」は厳密に制御されながら、胎生期に決定されている。この構築過程での異常はヒトの認知、記憶、情動の制御不全などの高次脳機能の形成に重大な障害を起す要因になると考えられている。「配置」は神経細胞の移動と定着によって制御されており、近年多くの関連因子の発見によりその機構の全体像が明らかにされてきた。一方で、「層特性」は神経発生時に定められることは予想されているが、そのメカニズムの詳細は不明なままである。

近年、筆者らは神経系前駆細胞が最終分裂直前の細胞周期内にあるときに脳由来神経栄養因子 (BDNF) の皮質内濃度を変動させると、神経細胞が獲得する層特性が変化することを見いだした。本研究ではそのメカニズムの詳細を明らかにした。

2. 実 験

ペントバルビタール (30 mg/kg) 麻酔科に妊娠マウスの子宮を露出し、PBS に溶解した 600 ng/μl の BDNF または 2.0 μg/μl の抗 BDNF 抗体を同様の方法でマイクロインジェクターを用いて胎仔あたり 1 μl ずつ注入した。その後、子宮を腹腔内に戻し、腹部を縫合した。特に明記しない限り、その 3 時間後、母体腹腔より 50 mg/kg の 5'-bromodeoxyuridine (BrdU) 投与した後、解析に用いるまで、分娩も含めて通常どおりに飼育した。

3. 結果・考察

A. 脳室内での細胞挙動に対する BDNF の影響

大脳皮質神経細胞の前駆細胞は脳室帯とよばれる領域

において核を上下に運動させながら、盛んに増殖を繰り返し、その中から最終分裂をおえた細胞は神経細胞として発生する [すなわち、核が脳室面からもっとも離れたときに S 期を迎え、脳室面で細胞分裂 (M 期) し、G1 期には脳室面から離れていく。神経発生が起こる (E11-17) では、この細胞分裂時に 1 つの幼若な神経細胞と 1 つの神経系前駆細胞が発生する]。発生した幼若な神経細胞は将来の灰白質である皮質板に向かって移動を開始する。皮質板に到達した神経細胞はそれぞれの層に固有の性質を伴って分化成熟する。

これまでの研究成果から、BDNF を投与した場合、この脳室帯から皮質板に向かうタイミングが早められていることが分かっている¹⁾。そこで、脳室帯における細胞挙動を詳細に検討したところ、この過程が BDNF 投与群で早く進行する (Fig. 1) 結果、脳室帯からの離脱が早められることが明らかとなった。また、さまざまな解析の結果、細胞周期 S 期の長さが対象群では 3.3 時間であるのに対し、BDNF 投与群では 2.3 時間になっていることが分かった²⁾。これに加えて、神経系前駆細胞の維持に関わる転写因子 (Pax6) の発現が late S 期から G2 期にかけて一過性に低下していることも明らかにした²⁾。したがって、BDNF 処理によって最終分裂前の親細胞の細胞周期が変化することで、細胞内で機能する転写因子などの内因分子の発現や作用時間などが変化した結果、その娘細胞の神経細胞の性質が変化すると推定される。

B. BDNF の作用の臨界期

大脳皮質深層の神経細胞の層に固有の性質はその親細胞が最終分裂時の S 期に大脳皮質環境からのシグナルによって影響を受け、late S から G2 期に決定されることが知られている³⁾。このことから、BDNF も細胞周期 S 期に BrdU 陽性細胞の性質を変えた可能性がある。そこで、BrdU を投与する時間を E13 の 14:00 に固定し、その 6 時間前、3 時間前、あるいは 6 時間後に BDNF を投与して、生後 6 日後に脳を摘出し、大脳皮質内における

BrdU 陽性細胞の分布を観察した。BDNF および BrdU の有効濃度の持続時間がそれぞれ ~ 3 2)、 ~ 5 時間 4) であることを考慮すると、BrdU 陽性細胞はそれぞれ 6 時間前で 1 細胞周期前の G2/M から S 期、3 時間前で G1 から G2+M 期、1 時間後では G1 後期から 1 細胞周期後の G1 前期、6 時間後では S 期から 1 細胞周期後の G1 期に BDNF の作用を受けていることになる。解析の結果、BDNF の作用を S 期周辺で受けた時 (3 時間前と 1 時間後) にのみ BrdU 陽性細胞はより深層に定着するように変化することが明らかとなった (Fig. 2)。

まとめ

これまで、ニューロトロフィンやその受容体のノックアウトマウスでは、脳構築過程で生じたと考えられる顕著な異常が生じないことから、この過程における重要性は見過ごされてきた。ところが、今回、紹介した筆者らの研究成果は BDNF の中和抗体を用いて、内因性 BDNF の機能を阻害すると全く正反対の現象を誘導できることから、内因性の BDNF が類似の機能を持ち、大脳皮質形成に寄与していると考えられる。さらに、TrkB の Shc/PLC- γ の結合部位を変異させたマウスでは BDNF の中和抗体を投与したときと同様に同時期に発生した神経細胞が本来の定着層より上層に定着するようになることが報告されており 5)、BDNF/TrkB 経路が大脳皮質層形成に重要な働きを持つことが裏付けられている。その生物学的意義は明確ではないが、TrkB が脳室帯神経系前駆細胞で発現してい

ること、皮質板神経細胞での発現細胞が脳室帯神経系前駆細胞よりも数段多いこと 6) を考え合わせると、皮質板神経細胞で発現分泌される BDNF の量とそのときの皮質板から脳室帯までの距離によって神経系前駆細胞に対する BDNF の作用濃度が決定され、その時発生する神経細胞の性質がコントロールされているのかもしれない。

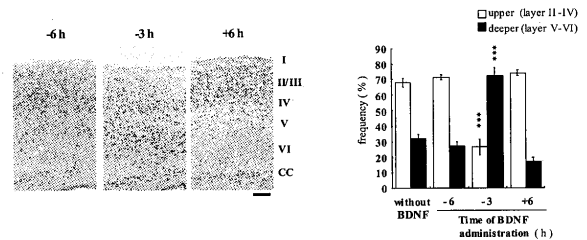


Figure 2 Critical time point for BDNF administration to alter laminar fate. Left panel: BDNF (600 ng in 2 μ l of PBS) was administered into the ventricular space of E13.5 mouse embryos 3 or 6 h before (-3 or -6) or 6 h after (+6) intraperitoneal injection of BrdU into pregnant mice carrying the experimental embryos. BrdU immunoreactivity in the cerebral cortex of P6 mice was visualized. Scale bar, 200 μ m. Right panel: BrdU⁺ cell numbers in each sector as a percentage of the total number of BrdU⁺ cells. Significant differences from the corresponding control (no treatment with BDNF) were determined by ANOVA with Tukey's *post hoc* test. Significance, *** $P < 0.005$ ($n=3$).

4. 引用文献

- 1) Ohmiya M *et al.* (2002) Brain-derived neurotrophic factor alters cell migration of particular progenitors in the developing mouse cerebral cortex. *Neurosci Lett* 317 21-24.
- 2) Fukumitsu H. *et al.* (2006) Brain-derived neurotrophic factor participates in determination of neuronal laminar fate in the developing mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 26: 13218-13230.
- 3) McConnell SK and Kaznowski CE (1991) Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science* 254: 282-285.
- 4) Takahashi T. *et al.* (1995) The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* 15: 6046-6057.
- 5) Medina DL. *et al.* (2004) TrkB regulates neocortex formation through the Shc/PLC γ -mediated control of neuronal migration. *EMBO J* 23: 3803-3814.
- 6) Fukumitsu H. *et al.* (1998) Simultaneous expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in Cajal-Retzius, subplate and ventricular progenitor cells during early development stages of the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 84 115-127.

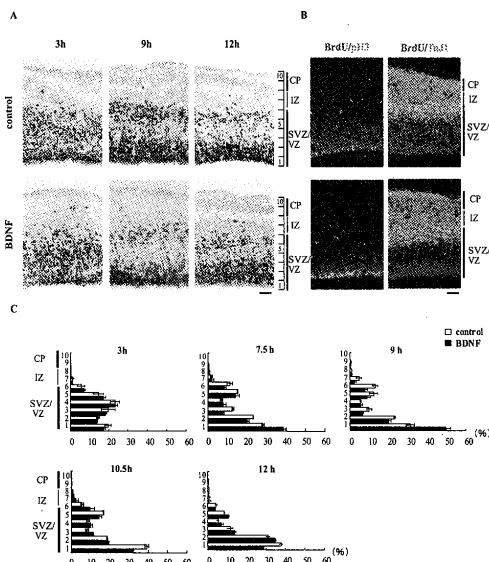


Figure 1 BDNF facilitates interkinetic migration of cortical progenitors. A: BrdU immunostaining patterns in the cerebral cortex at 3, 9, and 12 h after the injection. Interkinetic migration occurred normally even after BDNF administration, but the process was accelerated by BDNF. Scale bar, 50 μ m. B: Double immunostaining for BrdU and phosphorylated histone H3 or TuJ1 9 h after the BrdU injection. Scale bar, 50 μ m. C: Quantitative analysis of the distribution of BrdU⁺ nuclei.